

# 多剤耐性緑膿菌における病原因子pyocyaninの産生に関する研究

|        |   |
|--------|---|
| 著者     | 布施 克浩   |
| 号      | 81  |
| 学位授与機関 | Tohoku University   |
| 学位授与番号 | 医博第2943号  |
| URL    | <a href="http://hdl.handle.net/10097/62414">http://hdl.handle.net/10097/62414</a> |

|             |                                     |
|-------------|-------------------------------------|
| 氏 名         | ふ せ かつひろ<br>布施 克浩                   |
| 学 位 の 種 類   | 博士 (医学)                             |
| 学位授与年月日     | 平成 24 年 3 月 27 日                    |
| 学位授与の条件     | 学位規則第 4 条第 1 項                      |
| 研 究 科 専 攻   | 東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻          |
| 学 位 論 文 題 目 | 多剤耐性緑膿菌における病原因子 pyocyanin の産生に関する研究 |
| 論 文 審 査 委 員 | 主査 教授 張替 秀郎<br>教授 黒澤 一 客員教授 前門戸 任   |

## 論 文 内 容 要 旨

臨床で分離される *Pseudomonas aeruginosa* は、喀痰や尿から高い頻度で検出され、易感染性宿主における日和見感染や院内感染症の主要な原因菌である。*P. aeruginosa* の主要な産生毒素として、青緑色色素の pyocyanin が有り、その主な毒性は気道の線毛運動低下や粘液分泌抑制作用などが知られている。本菌は臨床において各種抗菌薬へ耐性を獲得しやすく、特にメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (metallo- $\beta$ -lactamase: MBL) 遺伝子の導入による多剤耐性の緑膿菌が世界中で猛威を振っており、本菌による肺炎や菌血症、および敗血症が深刻な問題となっている。しかしながら、臨床現場における MBL 産生の有無の判定には 4~5 日程度かかり、院内感染対策の初動に遅れが生じることが危惧されている。そこで私は、*P. aeruginosa* における薬剤耐性を色彩の違いから早期に鑑別できないか検討した。

東北地方の一般市中病院より分離された *P. aeruginosa* 50 株を被検菌株とし、その内訳は、MBL 産生株が 20 株、MBL 非産生株が 30 株であった。また、*P. aeruginosa* 標準株 PAO-1 株と MBL 遺伝子導入 PAO-1 株も使用した。臨床分離株の MBL 遺伝子の有無は、SMA ディスク法ならびに PCR 法を用いて判定し、MBL 産生株 20 株の全てが *bla*<sub>IMP-1</sub> 遺伝子を保有していた。Pyocyanin の産生能は、平板培地の色彩変化と産生された pyocyanin の定量により評価した。色彩は、一定濃度の菌液を 18 時間培養した寒天平板を国際照明委員会の基準による色彩色差計を用いて色度および明度を測定した。色彩は、MBL 産生株群では MBL 非産生株群に比べ、緑色傾向が低下 ( $P<0.05$ ) し、黄色傾向は高かった ( $P<0.001$ )。また、明度は強く、明るい傾向を示した ( $P<0.001$ )。すなわち、MBL 産生株は黄緑色を示す傾向が確認された。この傾向は、標準株 PAO1 に MBL 遺伝子を導入させた株においても同様であった。Pyocyanin の産生量は、逆相高速液体クロマトグラフィーを用い定量測定した。さらに、MBL 産生株群と MBL 非産生株群より無作為にそれぞれ 3 株ずつ選択し、pyocyanin 合成酵素である PhzM と PhzS をコードする遺伝子の mRNA の発現を定量的リアルタイム PCR 法により確認した。MBL 産生株群の pyocyanin の産生量は、MBL 非産生株群と比べ、有意に低下していた ( $P<0.05$ )。同様に MBL 導入 PAO1 株の pyocyanin の産生量は標準株 PAO1 株に比べ有意に低かった ( $P<0.05$ )。相対的な pyocyanin 合成酵素 PhzM と PhzS の mRNA の発現比較では、MBL 非産生株を基準にした時、MBL 産生株における発現は、それぞれ低下していた ( $P<0.05$ )。同様に標準株 PAO1 株に比し、MBL 導入 PAO1 株においても各々の発現が低下していた。今回の検討によって、MBL 産生の多剤耐性株において pyocyanin 産生量が MBL 非産生株より低かったことから、多剤耐性株は黄緑色を呈し、一方、感受性株は青緑色を示すことが明らかになった。更なる検討は必要であるが、この性質を応用し、MDRP の早期鑑別が可能になると考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題目 多剤耐性緑膿菌における病原因子 pyocyanin の産生に関する研究

所属専攻・分野名 医科学 専攻 呼吸器病態学 分野  
学籍番号 氏名 布施 克浩

本研究の背景として、易感染性宿主における日和見感染や院内感染症の主要な原因菌である *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) は臨床において各種抗菌薬へ耐性を獲得しやすく、特にメタロ-β-ラクタマーゼ (metallo-β-lactamase: MBL) 遺伝子の導入による多剤耐性の緑膿菌が世界中で猛威を振っており、本菌による肺炎や菌血症、および敗血症が深刻な問題となっている。しかしながら、臨床現場における MBL 産生の有無の判定には 4~5 日程度かかり、院内感染対策の初動に遅れが生じることが危惧されている。*P. aeruginosa* の主要な産生毒素としては気道の線毛運動低下や粘液分泌抑制作用などが知られている青緑色色素の pyocyanin が有る。

本研究の目的は *P. aeruginosa* の主要な産生毒素として青緑色色素の pyocyanin を利用することによって、*P. aeruginosa* における薬剤耐性を色彩の違いから早期に鑑別する方法を探ることにある。

方法としては、東北地方の一般市中病院より分離された *P. aeruginosa* 50 株を被検菌株とし、その内訳は、MBL 産生株が 20 株、MBL 非産生株が 30 株を対象とした。また、*P. aeruginosa* 標準株 PAO-1 株と MBL 遺伝子導入 PAO-1 株も使用した。臨床分離株の MBL 遺伝子の有無は、SMA ディスク法ならびに PCR 法を用いて判定した。Pyocyanin の産生能は、平板培地の色彩変化と産生された pyocyanin の定量により評価した。色彩は、一定濃度の菌液を 24 時間培養した寒天平板を国際照明委員会の基準による色彩色差計を用いて色度および明度を測定した。

その結果、MBL 産生株 20 株の全てが *bla*<sub>IMP-1</sub> 遺伝子を保有していたことが判明した。色彩は、MBL 産生株群では MBL 非産生株群に比べ、緑色傾向が低下 ( $P<0.05$ ) し、黄色傾向は高かった ( $P<0.001$ )。また、明度は強く、明るい傾向を示した ( $P<0.001$ )。すなわち、MBL 産生株は黄緑色を示す傾向が確認された。この傾向は、標準株 PAO1 に MBL 遺伝子を導入させた株においても同様であった。Pyocyanin の産生量は、逆相高速液体クロマトグラフィーを用い定量測定した。さらに、MBL 産生株群と MBL 非産生株群より無作為にそれぞれ 3 株ずつ選択し、pyocyanin 合成酵素である PhzM と PhzS をコードする遺伝子の mRNA の発現を定量的リアルタイム PCR 法により確認した。MBL 産生株群の pyocyanin の産生量は、MBL 非産生株群と比べ、有意に低下していた ( $P<0.05$ )。同様に MBL 導入 PAO1 株の pyocyanin の産生量は標準株 PAO1 株に比べ有意に低かった ( $P<0.05$ )。相対的な pyocyanin 合成酵素 PhzM と PhzS の mRNA の発現比較では、MBL 非産生株を基準にした時、MBL 産生株における発現は、それぞれ低下していた ( $P<0.05$ )。同様に標準株 PAO1 株に比し、MBL 導入 PAO1 株においても各々の発現が低下していた。

以上の結果から、MBL 産生の多剤耐性株において pyocyanin 産生量が MBL 非産生株より低く、多剤耐性株は黄緑色を呈したのに対し、感受性株は青緑色を示すことが明らかになり、MDRP の早期鑑別の可能性を示唆された。

よって、本論文は博士 (医学) の学位論文として合格と認める。